



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월16일
(11) 등록번호 10-1878441
(24) 등록일자 2018년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0662 (2013.01)
C12N 2501/11 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0019795
(22) 출원일자 2017년02월14일
심사청구일자 2017년02월14일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080094431 A*
KR1020070104735 A*
KR1020140000945 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
임재영
경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 102동 160
2호(주약동, 삼환 나우빌)
박찬후
경상남도 진주시 초장로14번길 27, 103동 1503호
(초전동, 진주초전푸르지오1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 1 항

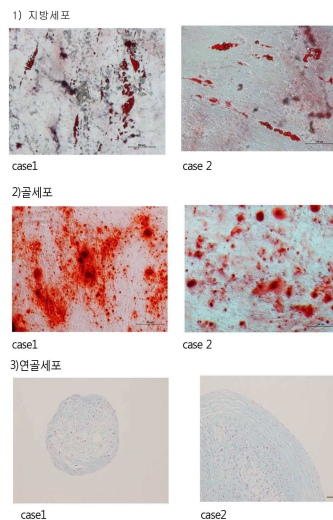
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법에 관한 것으로, 본 발명을 통해 개발된 특정 성장 호르몬을 포함하는 분화배지(differential media)를 이용한 경우, 2cc 신생아 말초혈액으로부터 중간엽 줄기세포만을 손쉽게 분리 및 배양할 수 있는 점을 확인하였다. 따라서, 본 발명을 토대로 비교적 손쉽게 얻은 중간엽 줄기세포를 이용하여 여러 가지 질환의 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 2501/113 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

C12N 2501/33 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

(72) 발명자

우향욱

경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 103동 1602호(주약동, 삼환 나우빌)

도현정

경상남도 창원시 성산구 대암로 256

박은실

경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 102동 2302호(주약동, 삼환 나우빌)

박지숙

경상남도 진주시 신안로34번길 12, B동 306호(신안동, 목화조합주택)

염정숙

경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 102동 1703호(주약동, 삼환 나우빌)

윤희상

경상남도 진주시 칠암동 505-53

서지현

경상남도 진주시 강남로 45, 101동 1003호(주약동, 금호석류마을)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

(a) 신생아 말초혈액을 원심분리하여 세포만을 분리하는 단계;

(b) 상기 분리된 세포에 PBS(phosphate buffered saline)을 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척하는 방법을 2~4회 수행한 후 세포만을 수집하는 단계;

(c) 상기 수집한 세포에 4~6%(v/v)의 B27, 18~22 ng/ml 표피 성장인자, 8~12 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자, 18~22 ng/ml의 젠타마이신, 0.8~1.2 ng/ml의 하이드로코티손, 4~6 ng/ml의 인슐린 및 80~120 μ M의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하는 단계;

(d) 상기 (c) 단계의 배양 후 얻은 배양물에 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 추가하고 세포 군락이 보일 때까지 배양하는 단계;

(e) 상기 (d) 단계의 배양 후 얻은 배양물의 배양 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척한 후, 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 3~4주 더 배양하는 단계;

(f) 상기 (e) 단계의 배양물에 0.2~0.3%(w/v) 트립신 EDTA를 넣고, 5% CO₂ 배양기에서 6~8분간 배양하여 면역세포를 사멸시키는 단계; 및

(g) 상기 (f) 단계의 면역세포가 사멸된 배양물을 코니컬 튜브로 옮긴 후 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척한 후, 디쉬(dish)로 옮겨 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 배양하여 중간엽 줄기세포를 수득하는 단계를 포함하는 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 분리 및 배양하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 여러 조직에서 얻을 수 있는 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포의

두 가지 특징은 자기 생산(self-renewal)과 분화 자극에 의한 분화능(differentiation)이다.

[0003] 중간엽 줄기세포는 용모막, 태반, 양수 및 탯줄 등에서 분리가능하고, 여기서 분리한 세포가 더 미분화되어 분화능이 크지만 얻기 힘들다. 중간엽 줄기세포 중에서도 몇몇 줄기세포는 그 이용에 있어서 세포를 얻는데 큰 제한이 있기 때문에 그 이용이 어렵다. 예를 들어, 제대혈, 지방조직으로부터 유래한 중간엽 줄기세포는 침습적인 방법을 이용해 얻어야만 한다. 가장 비침습적인 방법을 이용해 얻을 수 있는 세포는 골수채취를 통한 중간엽 줄기세포이지만, 골수 채취는 마취가 필요하고 고통을 유발하여, 그 이용에 제한이 있다. 이에 대한 대안으로 환자 맞춤형 줄기세포를 분리하기 위해 말초혈액을 이용한 세포획득법 등이 요구되고 있으나 말초혈액만으로는 성인에서 분리할 수 있는 중간엽 줄기세포의 수가 너무 적고 분리방법이 경제적이지 못하며, 분리해낸다고 해도 세포치료에 사용가능한 양만큼 증식이 원활하지 않은 경우가 대부분이기에 좀 더 실용성을 높일 수 있는 대체 방안이 필요하다.

[0004] 하지만 신생아는 매우 적은 혈액에서도 충분한 줄기세포가 존재하여 경제적이고 새로운 배양방법을 이용하면 세포치료에 사용가능한 양만큼의 증식이 원활하여 실용성 및 산업화가 가능하게 되었다. 또한, 고령인 환자에서 얻는 성체 줄기세포는 낮은 연령에게서 얻는 세포들에 비해 증식능력이 현저히 떨어지며 각종 인자들의 분비 및 줄기세포의 병변으로 이동 능력 등이 떨어지기 때문에, 저연령의 환자로부터 자연스럽게 분리될 수 있거나 버려지는 조직으로부터 세포를 얻을 필요성이 있다. 또한, 이렇게 얻어진 세포는 실험에 용이한 양적 확보가 가능하고 세포의 계대 배양 시에 분화능이 잘 유지될 필요성이 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0908481호에서는 '중간엽 줄기세포 배양 배지 및 이를 이용한 중간엽 줄기세포의 배양 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1613604호에서는 '미분화 인간 만능줄기세포의 세포칩 기반 정량 분석 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포의 분리 및 배양 방법에 관해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 줄기세포 배양의 걸림돌인 다른 세포들의 이입(contamination)으로 순수한 줄기세포의 배양을 힘들게 하던 난관을 해결하기 위해, 첫번째 단계에서 혈청이 포함되지 않은 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하여 섬유아세포(fibroblast)의 이입을 막았고, 면역세포들이 혼합되어 자랄 수 없게 특수 성장인자만이 포함된 배양액을 이용한 배양으로 우리가 원하는 중간엽 줄기세포만을 순수분리하였다.

[0007] 특히, 본 발명은 신생아 말초혈액을 대상으로 혈청이 포함되지 않은 PBS로 세척한 후, 5%의 B27, 20 ng/ml 표피 성장인자(epidermal growth factor), 10 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor), 20 ng/ml의 젠타마이신, 1 ng/ml의 하이드로코티손, 5 ng/ml의 인슐린 및 100 μ M의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지에서 배양하여 면역세포의 성장은 저해하고 순수한 중간엽 줄기세포만을 배양할 수 있는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 B27, 표피 성장인자(epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor), 젠타마이신, 하이드로코티손, 인슐린 및 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 유효성분으로 함유하는 신생아 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC) 순수배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은

[0010] (a) 신생아 말초혈액을 원심분리하여 세포만을 분리하는 단계;

[0011] (b) 상기 분리된 세포에 PBS(phosphate buffered saline)을 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척하는 방법을 반복 수행한 후 세포만을 수집하는 단계;

[0012] (c) 상기 수집한 세포에 4~6%의 B27, 18~22 ng/ml 표피 성장인자, 8~12 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자, 18~22 ng/ml의 젠타마이신, 0.8~1.2 ng/ml의 하이드로코티손, 4~6 ng/ml의 인슐린 및 80~120 μ M의 베타머캅토에탄올

(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 첨가하여 배양하는 단계;

[0013] (d) 상기 (c) 단계의 배양 후 얻은 배양물에 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 추가하고 세포 군락이 보일 때까지 배양하는 단계;

[0014] (e) 상기 (d) 단계의 배양물에 0.2~0.3% 트립신 EDTA를 넣고 배양하여 면역세포를 사멸시키는 단계; 및

[0015] (f) 상기 (e) 단계의 면역세포가 사멸된 배양물을 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, 디쉬(dish)로 옮겨 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 배양하여 중간엽 줄기세포를 수득하는 단계를 포함하는 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 분리 및 배양하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 분리 및 배양된 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 기존에 성인의 말초혈액에서 줄기세포를 분리하기 위해서는 약 500ml의 혈액에서 50~75%의 단백구를 포함하는 분획(fraction)에서 5백만 개의 세포로부터 중간엽 줄기세포를 분리하였는데, 이는 많은 혈액량을 필요로 하고, 매우 복잡하고 까다로운 방법으로 분리해야 하는 번거로움이 있었다. 그러나, 본 발명을 통해 개발된 특정 성장 호르몬을 포함하는 분화배지(differential media)를 이용한 경우, 2cc 신생아 말초혈액으로부터 중간엽 줄기세포만을 손쉽게 분리 및 배양할 수 있는 점을 확인하였다. 따라서, 본 발명을 토대로 비교적 손쉽게 얻은 중간엽 줄기세포를 이용하여 여러 가지 질환의 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명을 통해 검사 후 버려지는 말초혈액을 세척, enrichment를 거쳐 성장인자가 있는 배지에서 분리하는 단계를 모식화한 것이다.

도 2 및 도 3은 본 발명에서 분리 배양한 신생아 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)의 FACS 데이터를 나타낸다.

도 4는 본 발명에서 분리한 세포(PBSC)와 기존의 골수 유래 줄기세포와 형태적인 비교를 나타낸 것이다. A : 5세된 남아의 골수 유래 중간엽 줄기세포, B: 1세된 여아의 골수 유래 중간엽 줄기세포

도 5는 본 발명에서 분리 배양한 신생아 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)로부터 분화된 지방세포(1), 골세포(2) 및 연골세포(3)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 B27, 표피 성장인자(epidermal growth factor), 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor), 젠타마이신, 하이드로코티손, 인슐린 및 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 유효성분으로 함유하는 신생아 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC) 순수배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 배지 조성물에서, 상기 배지는 바람직하게는 4~6%의 B27, 18~22 ng/ml 표피 성장 인자(epidermal growth factor), 8~12 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자(fibroblast growth factor), 18~22 ng/ml의 젠타마이신, 0.8~1.2 ng/ml의 하이드로코티손, 4~6 ng/ml의 인슐린 및 80~120 μ M의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "배지"는 당업계에서 통상적으로 이용되는 동물세포용 배지인 DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980))인 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지에 4~6%의 B27, 18~22 ng/ml 표피 성장인자, 8~12 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자, 18~22 ng/ml의 젠타마이신, 0.8~1.2 ng/ml의 하이드로코티손, 4~6 ng/ml의 인슐린 및 80~120 μ M의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 배지로, 신생아 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem

cell, PBSC)를 순수배양하는데 매우 효과적이다.

- [0022] 또한, 본 명세서에서 용어 "중간엽 줄기세포"는 지방세포, 골세포, 연골 세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포는 수용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-) 등의 발현 정도를 통하여 식별된다.
- [0023] 또한, 본 발명은
- [0024] (a) 신생아 말초혈액을 원심분리하여 세포만을 분리하는 단계;
- [0025] (b) 상기 분리된 세포에 PBS(phosphate buffered saline)을 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척하는 방법을 반복 수행한 후 세포만을 수집하는 단계;
- [0026] (c) 상기 수집한 세포에 4~6%의 B27, 18~22 ng/ml 표피 성장인자, 8~12 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자, 18~22 ng/ml의 젠타마이신, 0.8~1.2 ng/ml의 하이드로코티손, 4~6 ng/ml의 인슐린 및 80~120 μ M의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 첨가하여 배양하는 단계;
- [0027] (d) 상기 (c) 단계의 배양 후 얻은 배양물에 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 추가하고 세포 군락이 보일 때까지 배양하는 단계;
- [0028] (e) 상기 (d) 단계의 배양물에 0.2~0.3% 트립신 EDTA를 넣고 배양하여 면역세포를 사멸시키는 단계; 및
- [0029] (f) 상기 (e) 단계의 면역세포가 사멸된 배양물을 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후, 디쉬(dish)로 옮겨 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 배양하여 중간엽 줄기세포를 획득하는 단계를 포함하는 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 분리 및 배양하는 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 (a) 단계는 세포를 세포 보관액으로부터 분리하기 위한 단계이며,
- [0031] 상기 (b) 단계는 불순물 및 잔여 보관액 제거와 동시에 면역세포가 증식하는데 필요한 FBS를 모두 세척하여 면역세포 성장을 저해시키고, PBSC의 선택적 배양이 가능하게 하기 위한 단계이며,
- [0032] 상기 (c) 단계는 PBSC의 선택적 배양에 알맞은 조성의 상기의 DMEM/F12 배지와 플레이트 바닥에 붙어 증식하는 PBSC의 세포적 특성을 이용하여 목적하는 PBSC만을 선택적으로 배양하기 위한 단계이며,
- [0033] 상기 (d) 단계는 세포 호흡 또는 사멸 세포로 인해 선택적으로 자라고 있는 PBSC 세포에 영양을 주지 않고, PBSC가 잘 증식할 수 있는 환경을 제공하기 위한 단계이며,
- [0034] 상기 (e) 단계는 0.05% 트립신 EDTA 처리시 면역세포가 사멸되므로, 잔여 면역세포를 사멸시키기 위해 0.2~0.3% 트립신 EDTA를 처리하는 단계이며,
- [0035] 상기 (f) 단계는 PBSC 증식량을 늘리기 위함과 동시에 서브컬처를 하여 무한증식이 가능한 PBSC를 선택적으로 얻기 위한 단계이다.
- [0036] 바람직하게는, 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은,
- [0037] (a) 신생아 말초혈액을 원심분리하여 세포만을 분리하는 단계;
- [0038] (b) 상기 분리된 세포에 PBS(phosphate buffered saline)을 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척하는 방법을 2~4회 수행한 후 세포만을 수집하는 단계;
- [0039] (c) 상기 수집한 세포에 4~6%의 B27, 18~22 ng/ml 표피 성장인자, 8~12 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자, 18~22 ng/ml의 젠타마이신, 0.8~1.2 ng/ml의 하이드로코티손, 4~6 ng/ml의 인슐린 및 80~120 μ M의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하는 단계;
- [0040] (d) 상기 (c) 단계의 배양 후 얻은 배양물에 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 추가하고 세포 군락이 보일 때까지 배양하는 단계;
- [0041] (e) 상기 (d) 단계의 배양 후 얻은 배양물의 배양 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척한 후, 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 3~4주 더 배양하는

단계;

- [0042] (f) 상기 (e) 단계의 배양물에 0.2~0.3% 트립신 EDTA를 넣고, 5% CO₂ 배양기에서 6~8분간 배양하여 면역세포를 사멸시키는 단계; 및
- [0043] (g) 상기 (f) 단계의 면역세포가 사멸된 배양물을 코니컬 튜브로 옮긴 후 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척한 후, 디쉬(dish)로 옮겨 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 배양하여 중간엽 줄기세포를 수득하는 단계를 포함하는 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 분리 및 배양하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며,
- [0044] 가장 바람직하게는, 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법은,
- [0045] (a) 신생아 말초혈액을 원심분리하여 세포만을 분리하는 단계;
- [0046] (b) 상기 분리된 세포에 PBS(phosphate buffered saline)을 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척하는 방법을 3회 수행한 후 세포만을 수집하는 단계;
- [0047] (c) 상기 수집한 세포에 5%의 B27, 20 ng/ml 표피 성장인자, 10 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자, 20 ng/ml의 젠타마이신, 1 ng/ml의 하이드로코티손, 5 ng/ml의 인슐린 및 100 μM의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에 서 배양하는 단계;
- [0048] (d) 상기 (c) 단계의 배양 후 얻은 배양물에 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 추가하고 세포 군락이 보일 때까지 배양하는 단계;
- [0049] (e) 상기 (d) 단계의 배양 후 얻은 배양물의 배양 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척한 후, 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 3~4주 더 배양하는 단계;
- [0050] (f) 상기 (e) 단계의 배양물에 0.25% 트립신 EDTA를 넣고, 5% CO₂ 배양기에서 7분간 배양하여 면역세포를 사멸시키는 단계; 및
- [0051] (g) 상기 (f) 단계의 면역세포가 사멸된 배양물을 코니컬 튜브로 옮긴 후 PBS(phosphate buffered saline)를 첨가하여 현탁한 후 원심분리하여 세포를 세척한 후, 60~100mm 디쉬(dish)로 옮겨 상기 (c) 단계의 DMEM/F12 배지를 첨가하고 배양하여 중간엽 줄기세포를 수득하는 단계를 포함하는 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 분리 및 배양하는 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 분리 및 배양된 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 제공한다.
- [0053] 본 발명의 일 구현 예에 따른 신생아 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포에서, 상기 분리 및 배양된 중간엽 줄기세포는 CD44, CD73, CD90 및 CD105로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 표면 마커에 대해 양성이고, CD34 또는 CD45에 대하여 음성인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 또한, 본 명세서에서 용어 "중간엽 줄기세포"는 지방세포, 골세포, 연골 세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중간엽 줄기세포는 소용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-) 등의 발현 정도를 통하여 식별된다.
- [0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] **실시예 1. 신생아 말초혈액에서 중간엽 줄기세포의 분리**
- [0057] 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC(Peripheral blood mononuclear cell)-derived mesenchymal stem cell, PBSC)는 경상대학병원 채혈을 시행한 신생아 환자로부터 검사 후 버려지는 혈액(임상윤리위원회 심의통과: IRB No: 2015-02-004-001)으로부터 분리하고자 하였다. 따라서 다음과 같은 실험 방법으로 수행되었다.
- [0058] 1. 냉동 보관 중인 혈액 샘플 1.5~2 ml을 코니컬 튜브에 넣고 1200rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포로부터 세포 보관액인 90% FBS(fetal bovine serum)와 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)를 분리하였다.

- [0059] 2. 불순물 및 남아 있는 보관액을 제거함과 동시에 면역세포가 증식하는데 필요한 FBS를 모두 세척하여 면역세포가 자랄 수 없고, PBSC(PBMC-derived mesenchymal stem cell)만이 선택적으로 증식할 수 있는 배지 환경을 제공하기 위해, 상기 원심분리하여 생성된 펠렛만 남기고 상층액을 흡입(suction)하여 제거한 뒤, PBS(phosphate buffered saline, 칼슘 및 마그네슘 없음)를 10ml 넣고 현탁시킨 후 1200rpm에서 5분간 원심분리하여 세포를 세척하는 단계를 3 반복 수행하였다.
- [0060] 3. PBSC를 선택적으로 배양하기 위해, 세척 마지막에 펠렛만 남기고, PBS를 흡입한 후, 1×10^6 개 이상의 세포를 6웰 플레이트에 5%의 B27, 20 ng/ml 표피 성장인자, 10 ng/ml의 섬유 아세포 성장 인자, 20 ng/ml의 쥘타마이신, 1 ng/ml의 하이드로코티손, 5 ng/ml의 인슐린 및 $100 \mu\text{M}$ 의 베타머캅토에탄올(bme)이 첨가된 DMEM/F12 배지를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.
- [0061] 4. 상기 배양 배지에 7일에 한번 배지를 추가로 첨가하고 세포 군락이 보이기 시작하면 배양 배지를 흡입하여 제거하고, 이후 PBS로 세척 후, 깨끗한 배지로 바꾸어 주었다. 이는 세포 호흡 또는 부산물과 죽은 세포들로 인해 선택적으로 자라는 세포에 영향을 받지 않게 하고, 목적 세포가 잘 증식할 수 있는 환경을 조성하기 위해서 수행한 것이다.
- [0062] 5. 세포 밀도가 약 80% (세포가 웰의 80% 밀도를 보일 때까지는 약 3~4주가 소요)가 되었을 때, 잔여 면역세포의 성장을 저해시키기 위해 0.25% 트립신 EDTA를 1ml 넣고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 7분간 처리하여 세포를 디쉬(dish)에서 분리하여, 이를 코니컬 튜브에 넣고, 1200rpm에서 5분간 원심분리하였다. 참고로, 면역세포의 경우 0.05% 트립신 EDTA를 건디지 못하고 사멸한다.
- [0063] 6. 펠렛만 남기고 EDTA를 흡입한 후 PBS 10ml을 넣어 세척하였다. 이후 60mm 또는 100mm 디쉬(dish)로 옮겨 상기 PBSC 선택적 배양을 위한 DMEM/F12 배지를 이용해 배양하였다. 이는 PBSC의 증식 양을 늘려가기 위함과 동시에 몇회에 걸쳐 서브컬처(subculture) 함으로써 무한증식이 가능한 특성을 가지는 PBSC를 얻기 위함이다.
- [0064] 상기와 같은 방법을 수행한 결과, 말초혈액 유래 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC) 분리율은 4명/6명(66%)였다. 대부분 채취일이 생후 1~7일 후에 얻은 혈액 샘플이었다. 약 백만개 이상의 세포를 6웰에 깔고 나서 세포 군락이 보이는 시점은 약 5~9일 정도 소요되었으며, 80% 정도의 confluency가 보일 때까지는 약 3~4주가 소요되었다(표 1). 세포의 모양은 양수나 태반 등에서 분리되는 줄기세포와 다르게 골수 유래 줄기세포와 유사한 길쭉길쭉한 모양의 섬유아세포(fibroblast)에 가까웠다(도 1).
- [0065] 1개월 이상 유아 20명에게도 이와 똑같은 방법을 이용하였지만 줄기세포는 분리되지 않았다. 따라서, 신생아만이 상기 방법으로 줄기세포의 분리가 가능하다고 분석되었다.

표 1

[0066] 본 발명에서 사용한 신생아 혈액 샘플 분석 결과

*신생아 주수	Total cell number ($10^5/\text{ml}$)	생후 말초혈액 채취 일	세포를 깬 이후 줄기세포 군락이 보인 날 / 80% CONFLUENCY가 보여 세포를 채집한 날짜
CASE-1/27주	90	1	8/28
CASE-2/38주	57	7	7/27
CASE-3/38주	14	1	X
CASE-4/32주	85	1	5/27
CASE-5/35주	3.7	1	X
CASE-6/29주	47	1	9/31
신생아 주수	몸무게	진단명	산소 사용여부
CASE-1/27주	1040gm	IRDS	0
CASE-2/38주	3300gm	Enterocolitis	X
CASE-3/38주	3000gm	Jaundice	X
CASE-4/32주	2300gm	preterm	X
CASE-5/35주	2600gm	preterm	X
CASE-6/29주	1140gm	IRDS	0

[0067] *상기 신생아 주수는 산모의 임신주수로, 산모가 신생아를 임신한 날로부터 태어날 때까지 잉태한 주수를 나타

낸다.

[0068] 실시예 2. 줄기세포의 FACS 데이터

[0069] 분리한 줄기세포를 대상으로 FACS 데이터는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 0.25% 트립신 EDTA를 이용하여 배양된 PBSC를 분리하여 수집한 후, 세포 3×10^5 개씩을 대상으로 PBS(phosphate buffered saline) 세척 후 CD 마커를 PBS 150 μ l에 1 μ l 정도 희석하여 4℃에서 1시간 반응시켰다(CD 마커를 붙이기 시작하면서부터 FACS를 시행하기 전까지 모두 차광해주는 것이 더 정확한 결과를 초래함). PBS(phosphate buffered saline) 2차례 세척 후 펠렛을 PBS(phosphate buffered saline) 1ml에 혼탁하여 FACS 전용 튜브에 옮긴 후 FACS 리더기에서 측정하였다.

[0070] 본 발명에서 분리한 PBSC 세포들의 P2-P3 정도에서 FACS를 시행하여 분리한 세포들이 CD34와 CD45가 음성이고, CD44, CD73, CD90 및 CD105가 90% 이상이라는 결과를 얻음으로써(도 2 및 도 3) 줄기세포의 임상시험에 충분히 사용할 수 있는 확신을 주었다. 기존의 연구와 달리 CD34는 모두 음성이어서 조혈모 혈액 줄기세포의 기능은 가지지 않았으며(도 4), 세포 모양은 골수 유래 중간엽 줄기세포(도 4A 및 도 4B)의 모양과 유사한 것을 확인하였다.

[0071] 실시예 3. 신생아 말초혈액 유래의 중간엽 줄기세포(PBMC-derived mesenchymal stem cell, PBSC)를 이용한 지방세포, 골세포 및 연골세포로의 분화

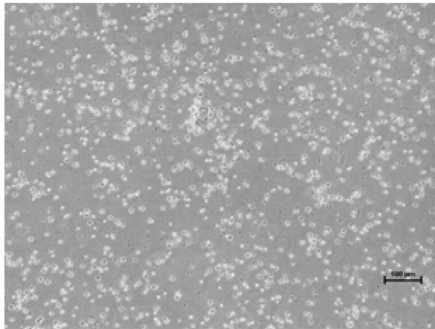
[0072] 상기 실시예 1의 PBSC 분리 배양 배지에서 60% 이상의 confluence가 되면 분리배양 배지를 제거한 후, Ca/Mg free PBS로 남은 배지를 세척한 후, 지방세포 분화 배지 MSC 기본 배지(Human) 900 μ l, 10X 지방생성 분화 첨가물(Adipogenic differentiation supplement, Human) 100 μ l, 500X 지방생성 분화 첨가물 2 μ l이 혼합된 배양 배지를 넣어주었다. 21일간 변화를 관찰하며, 3~4일에 한번씩 배지를 바꾸어 주면서 배양한 후, 0.3% 오일 레드 염색액을 1시간 처리하였다. 염색액을 완전히 제거 후 Ca/Mg free PBS로 세척 후 빨간색으로 염색된 지방 방울을 현미경으로 확인한 결과를 도 5A에 나타내었다.

[0073] 또한, 상기 PBSC 분리 배양 배지에서 60% 이상의 confluence가 되면 분리배양 배지를 제거한 후, Ca/Mg free PBS로 남은 배지를 세척한 후, 골아 세포 분화 배지 Osteo/Chondrocyte 분화 기본 배지 900 μ l, 골 형성 첨가물 100 μ l, 젠타마이신 용액 (10mg/ml) 0.5 μ l이 혼합된 배양 배지를 넣어주었다. 21일간 변화를 관찰하며, 3~4일에 한번씩 배지를 바꾸어 주었다. 남은 배지를 제거하고 Ca/Mg free PBS로 세척한 후, 3% 파라 포름알데히드/PBS로 30분 고정시켰다. Ca/Mg free PBS로 2회 세척한 후 2% Alizarin Red S(pH4.2)에 2분 동안 처리한 후, 용액들을 완전히 제거하고 Ca/Mg free PBS로 5분간 3회 세척하였다. 빨간색으로 염색된 미네랄을 현미경으로 확인한 결과를 도 5B에 나타내었다.

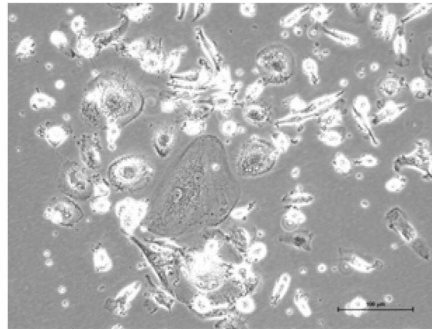
[0074] 또한, 상기 PBSC 분리 배양 배지에서 80% 이상의 confluence가 되면 분리배양 배지를 제거한 후, Ca/Mg free PBS로 남은 배지를 세척한 후, 0.25% 트립신 EDTA로 세포를 분리하고 Ca/Mg free PBS로 세척하였다. 3D로 세포를 키우기 위하여 상기 분리 배양 배지 20 μ l에 1×10^5 개씩 drop 모양으로 거꾸 배양하여 구모양으로 만들어 24시간 이후 Ca/Mg free PBS로 세척하였다. 연골 세포 분화 배지 Osteo/Chondrocyte 분화 기본 배지 900 μ l, 연골 형성 첨가물 100 μ l, 젠타마이신 (10mg/ml) 0.5 μ l이 혼합된 배양 배지를 바닥이 부착되지 않는 플레이트에 넣어 주고 세포 덩어리를 1개씩 따로 배양하였다. 21일간 변화를 관찰하며, 3~4일에 한번씩 배지를 바꾸어 주었다. 남은 배지를 제거하고 Ca/Mg free PBS로 세척하였다. 파라핀 절편 슬라이드를 제작하여, Deparaffinization과 Hydration을 거쳐 흐르는 물에 10분간 씻어주었다. Alcian blue 염색액에 30분간 염색 후 슬라이드에 묻은 염색액이 지워지도록 흐르는 물에 수세하였다. Dehydration 과정과 Clearing 과정을 거쳐 Mounting하여 현미경으로 가장자리 부분으로 갈수록 파란색으로 염색되었는지 또한 페이스트리(Pastry) 모양의 연골세포로 분화했는지 확인한 결과를 도 5C에 나타내었다.

도면

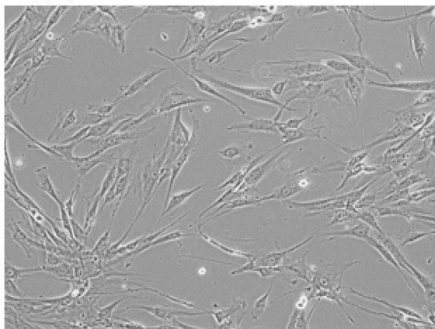
도면1



1단계



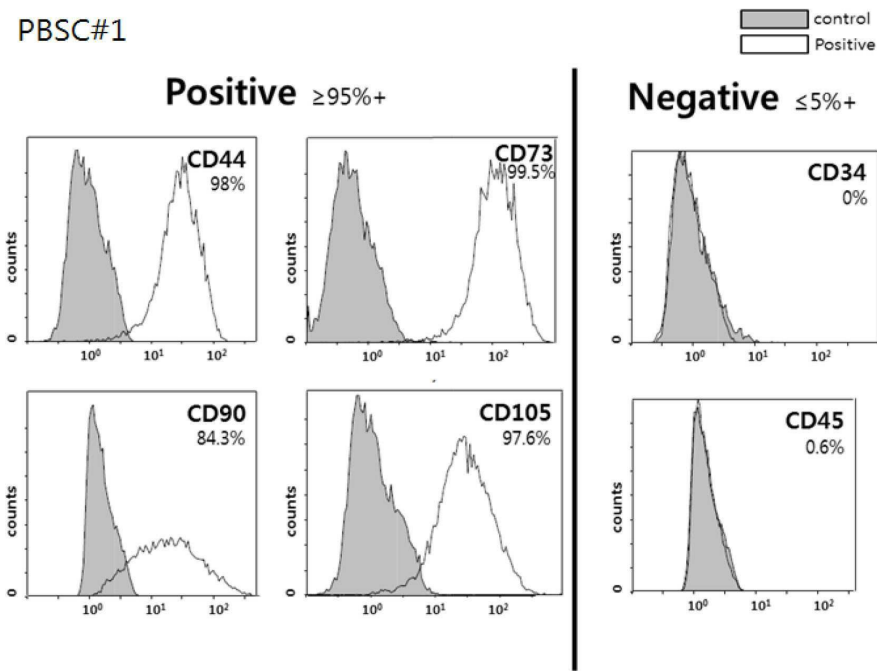
2단계 (PBSC의 10일째)



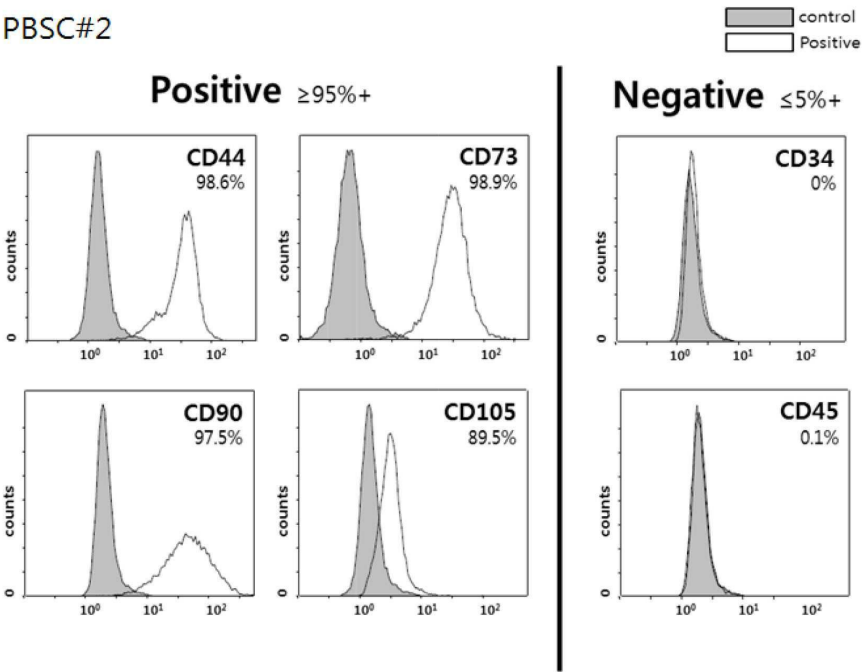
3단계 (PBSC의 31일째)

도면2

PBSC#1

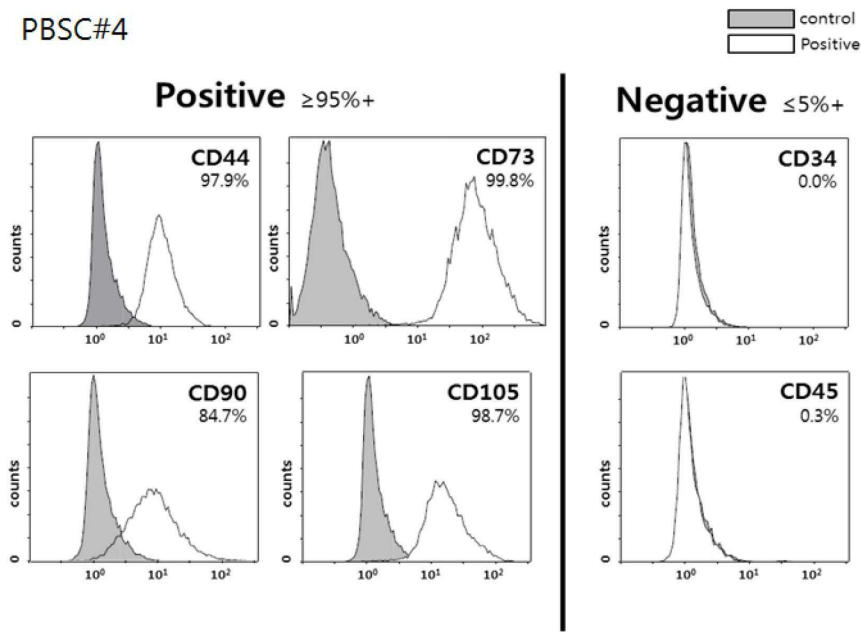


PBSC#2

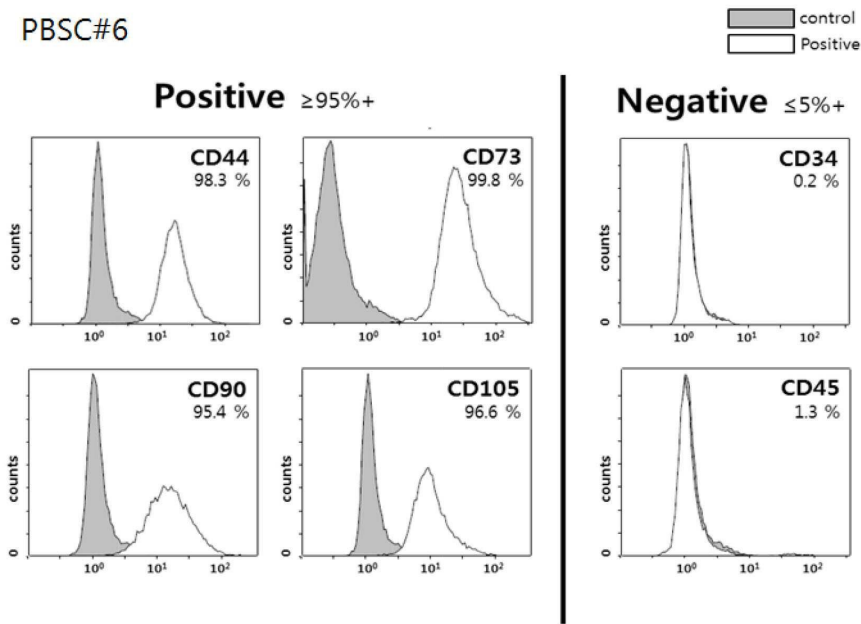


도면3

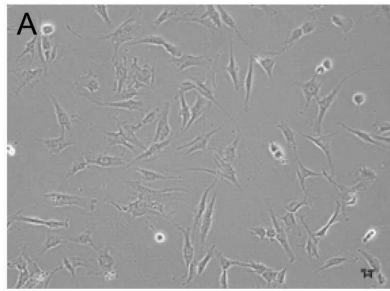
PBSC#4



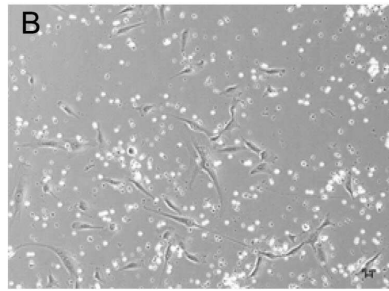
PBSC#6



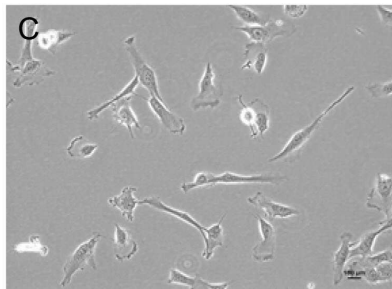
도면4



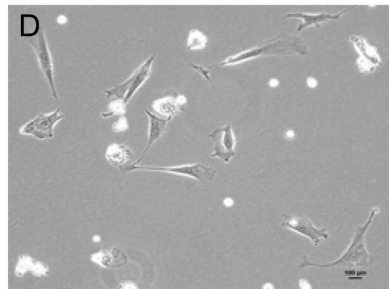
골수(1) 100X



골수(2) 100X



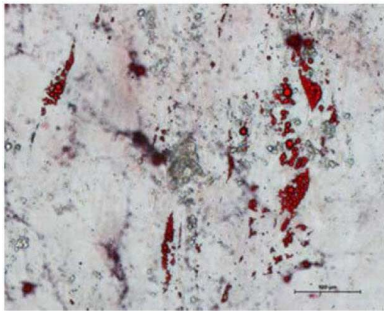
1번 PBSC 200X



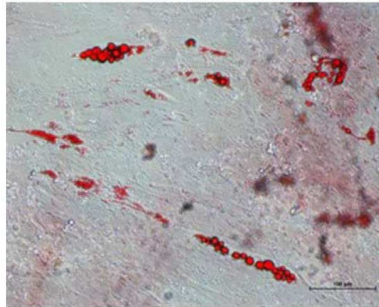
2번 PBSC 200X

도면5

1) 지방세포

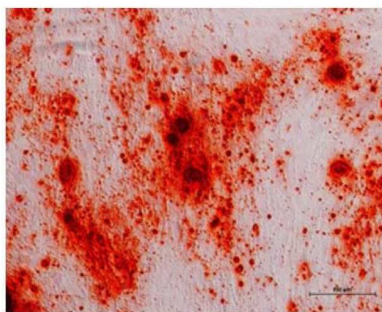


case1

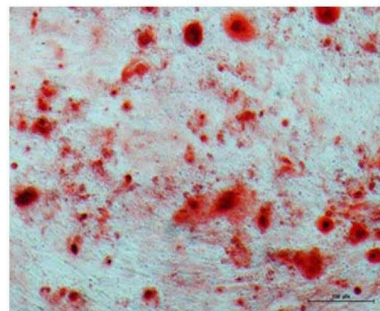


case 2

2)골세포

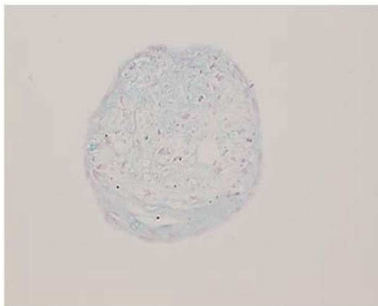


case1

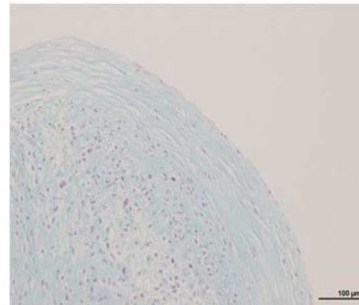


case 2

3)연골세포



case1



case2